基于 HPLC-ECD 研究牡荆叶抗氧化的谱-效关系

吴其妹[1], 李 影[1], 李志荣[2], 刘明容[1], 马继敏[2], 余念念[2], 陈荣祥[2,3], 周亚平[1*]
(1.遵义医科大学 药学院，贵州 遵义 563000；2.遵义医科大学 基础医学院，贵州 遵义 563000；3.遵义市理化分析测试工程技术研究中心，贵州 遵义 563000）

摘要：为了研究牡荆叶指纹图谱与抗氧化活性的谱-效关系，该文首先建立 18 批牡荆叶的高效液相色谱-电化学检测法（HPLC-ECD）指纹图谱，并对不同来源药材进行聚类分析；鉴定主要酚类化合物并测定其含量；分析牡荆叶的总酚和总黄酮含量，采用 DPPH 自由基清除法、ABTS 自由基清除法、氧自由基吸收能力法及铁离子还原能力法考察其体外抗氧化活性，通过皮尔逊相关性分析、灰度关联分析及偏最小二乘回归分析法研究牡荆叶的谱-效关系。结果表明：（1）牡荆叶的指纹图谱标定 21 个共有峰，共指认出 10 个峰，其含量顺序为绿原酸>异荭草苷>木犀草苷>异牡荆素>异绿原酸 A>异绿原酸 C>原儿茶酸>荭草苷>异绿原酸 B>新绿原酸；不同产地样品间相似性较高，相似度结果在 0.816~0.983 之间；（2）聚类分析表明样品含量对分类有一定影响，不同来源样品被分为 3 类，其中南北方样品存在一定差异；（3）牡荆叶中总酚和总黄酮含量分别在 15.82~61.83 $mg \cdot g^{-1}$ 和 27.85~157.65 $mg \cdot g^{-1}$ 之间，样品均具不同程度的抗氧化活性；（4）谱效关系表明，牡荆叶的抗氧化活性是多种化合物协同作用的结果，峰 9（异荭草苷）、峰 4 和峰 5（绿原酸）等化合物对牡荆叶药材抗氧化活性的贡献最大。该研究可为牡荆叶抗氧化活性成分的筛选及其质量控制提供参考依据。

关键词 牡荆叶，HPLC，电化学检测，抗氧化，谱-效关系，总酚，总黄酮
中图分类号：Q946 **文献标识码：**A

Spectrum-effect relationship of antioxidant activity in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* based on HPLC-ECD

WU Qimei[1], LI Ying[1], LI Zhirong[2], LIU Mingrong[1], Ma Jimin[2], YU Niannian[2], CHEN Rongxiang[2,3], ZHOU Yaping[1*]
(1. *School of Pharmacy, Zunyi Medical University*, Zunyi 563000, Guizhou, China; 2. *School of Basic Medicine, Zunyi Medical University*, Zunyi 563000, Guizhou, China; 3. *Zunyi Engineering Technology Research Center of Physical and Chemical Analysis*, Zunyi, 563000, Guizhou, China）

Abstract: In order to study the spectrum-effect relationship between fingerprint and antioxidant activity of the leaves of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* (*V. negundo*), the fingerprints of 18 batches of *V. negundo* were established by high performance liquid chromatography - electrochemical detection (HPLC-ECD) and the cluster analysis of medicinal materials from different sources was performed simultaneously. The main phenolic compounds from *V. negundo* were identified and determined. The contents of total phenolics and total flavonoids in *V. negundo* were analyzed, and the antioxidant activities *in vitro* were evaluated by the methods of DPPH radical scavenging capacity, ABTS radical scavenging capacity, oxygen radical absorbance capacity and ferric ion reducing ability power. The spectrum-effect relationships of *V. negundo* were analyzed by Pearson correlation analysis, gray relational analysis and partial least square regression analysis. The results were as follows: (1) The fingerprints of *V.negundo* were established with 21 common peaks and a total of 10 peaks were identified, the order of contents

基金项目：国家自然科学基金（21665031, 81760652）[Supported by National Natural Science Foundation of China (21665031, 81760652)]。
第一作者：吴其妹（1995-），硕士研究生，研究方向为药用植物开发与利用，(E-mail)510578364@qq.com。
***通信作者：**周亚平，博士，副教授，硕士研究生导师，研究方向为药物分析研究，(E-mail)yaping20302@163.com。

was as follows: chlorogenic acid > isoorientin > luteoloside > isovitexin > isochlorogenic acid A > isochlorogenic acid C > protocatechuic acid > orientin > isochlorogenic acid B > neochlorogenic acid. The similarity among the samples from different producing areas was high, and the values were ranged from 0.816 to 0.983. (2) The results of the cluster analysis showed that the content of the compounds had a certain influence on the classification and the samples from different sources were divided into three categories, among which the samples from the south and the north were different. (3) The contents of total phenolics and total flavonoids in *V.negundo* were 15.82 to 61.83 mg•g^{-1} and 27.85 to 157.65 mg•g^{-1}, respectively, and the antioxidant activity of all samples from *V negundo* existed differenece. (4) The spectrum-effect relationship indicated that the antioxidant activity of *V negundo* was the result of the synergistic effect of many compounds, and compounds such as peak 9 (isoorientin), peak 4 and peak 5 (chlorogenic acid) made the greatest contribution to the antioxidant activity of *V negundo*. This study provides a reference basis for the screening and quality control of antioxidant substances in *V negundo*.

Key words *Vitex negundo* var. *Cannabifolia,* HPLC, electrochemical detection, antioxidation, spectrum-effect relationship, total phenolics, total flavonoids

牡荆（*Vitex negundo* var. *cannabifolia*, *V. negundo*）来源于马鞭草科牡荆属植物，分布于中国华东各省及广西、广东、河北、贵州、四川等地，其叶具有解表化湿、祛痰平喘等功效（《全国中草药汇编》编写组，1996；国家药典委员会，2020）。牡荆主要成分为酚酸、黄酮、木脂素和萜类等化合物，现代药理研究表明，牡荆具有抗氧化、抗炎镇痛、抑菌、抗肿瘤等生物活性（舒柄垚等，2020）。抗氧化是牡荆的主要生物活性之一，向蓉等（2021）研究表明牡荆水提取物和醇提取物均具有一定的抗氧化活性，其中酚酸和黄酮类物质是其主要活性成分，Hu 等（2015）研究也证实大部分酚酸类物质具有较强的 2, 2′-联氮-二（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）（ABTS）自由基清除活性。然而，其抗氧化活性药效物质基础尚不明确，且未将指纹图谱结合生物活性进行质量控制评价研究。

谱效关系研究是将药用植物的指纹图谱与其药效结果相结合起来，通过建立“谱-效”数学模型来反映中药的内在品质的质量标准，因此，被广泛应用于药用植物内在质量控制评价研究（王勤等，2017；晏朝操和张建峰，2020）。由于 HPLC 具有灵敏度高、分离度和重现性好、高效快速、应用范围广等特点，目前已成为色谱指纹图谱研究的首选方法，而电化学检测法（electrochemical detection, ECD）是测量物质的电信号变化，可选择性地检测具有氧化还原性质的化合物，如带有硝基、巯基、酚羟基等基团的有机化合物，因此，可用 HPLC-ECD 筛查药用植物的抗氧化活性成分（罗敏等，2020; Zhang et al., 2021）。目前，谱效关系研究的分析方法众多，其中灰度关联分析法（gray relational analysis, GRA）能够分析共有峰峰面积的变化与药效指标的变化趋势，偏最小二乘回归分析方法（partial least square regression analysis, PLSR）对于系统的信息和噪声更易于辨别，可以弥补灰色关联度分析法中关联度均为正值所带来分析误差（刘晓燕等，2020)。因此，常将 GRA 和 PLSR 相结合应用于谱效关系分析研究。

因此，本研究收集 18 批不同来源的牡荆叶样品，采用 HPLC-ECD 和体外抗氧化活性评价方法，通过建立 HPLC-ECD 指纹图谱并结合样品含量测定、聚类分析（hierarchical cluster analysis, HCA）和谱效关系分析，拟探讨以下问题：（1）牡荆叶中的化学成分及其含量；（2）牡荆叶不同化学成分对抗氧化活性的贡献。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材与试剂

原儿茶酸、绿原酸、木犀草苷、没食子酸、奎诺二甲基丙烯酸酯（trolox）（阿拉丁生化科技股份有限公司，批号分别为 K1717091、J1523050、10122401、L1810248、A2010059，纯度≥97%）；荭草苷、异荭草苷、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C（成都普菲德生物技术有限公司，批号分别为 20031202、20052201、19042305、20032601、

20032602、20080802，纯度≥98%）；芦丁（国药集团化学试剂有限公司，批号 2016092，纯度≥95%）；甲醇、乙腈均为色谱级，购自北京伊诺凯科技有限公司；其余试剂均为分析纯。

新鲜牡荆叶样品采摘于广西、广东和河北，按照 2020 年《中国药典》中牡荆叶的鉴定要求，经遵义医科大学孟令杰博士鉴定为马鞭草科牡荆属牡荆（*Vitex negundo* var. *cannabifolia*）的叶，其详细信息见表 1。新鲜牡荆叶于 40 ℃下烘干后，分别粉碎并过 50 目筛，放置在 4 ℃条件下保存备用。

表 1 牡荆来源信息

Table 1 Sources of *V. negundo*

样品编号 Sample number	产地 Place of origin	采集时间 Harvest time	样品编号 Sample number	产地 Place of origin	采集时间 Harvest time
S1	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-06	S10	广东潮州 Chaozhou, Guangdong	2021-10-08
S2	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-06	S11	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-10-13
S3	广东清远 Qingyuan, Guangdong	2021-10-07	S12	广西来宾 Laibin, Guangxi	2021-09-02
S4	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-06	S13	广西来宾 Laibin, Guangxi	2021-09-02
S5	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-18	S14	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong	2021-10-10
S6	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-18	S15	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-10-13
S7	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-20	S16	河北保定 Baoding, Hebei	2021-10-15
S8	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-20	S17	河北保定 Baoding, Hebei	2021-10-15
S9	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-09-20	S18	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2021-10-20

1.1.2 仪器

Thermo UltiMate 3000 bio-RS 型 HPLC 仪，检测器为 ECD-3000 RS；Sorvall ST 8R 型高速离心机（美国赛默飞世尔科技有限公司）；SpectraMax i3x 型多功能酶标仪（美谷分子仪器（上海）有限公司）；ME104E 型电子天平（梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司）；Purelab Chorus 2 型纯水超纯水系统（英国埃尔格公司）；GZX-9070MBE 型电热鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司医疗设备厂）。

1.2 方法

1.2.1 标准品溶液的制备

精密称取原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异牡荆素、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 适量，用甲醇溶解制成 2 mg•mL^{-1} 的标准品储备液，于 -20 ℃下冷冻保存以备用。

1.2.2 供试品溶液的制备

分别精密称取不同批号的牡荆叶样品，以 80%甲醇为溶剂，按 1 g: 30 mL 的料液比在 25 ℃下超声提取 30 min，于 9 000 r•min^{-1} 条件下离心 5 min，取上清液加 80%甲醇按 1: 1 等体积稀释混匀，过 0.22 μm 有机滤膜即制得供试品溶液。

1.2.3 色谱条件

XBridge BEH shield RP18 色谱柱（3.0 mm × 150 mm, 2.5 μm）；流动相乙腈（A）-甲酸铵柠檬酸混合溶液（B）（25 mmol•L^{-1} 甲酸铵溶液和 25 mmol•L^{-1} 柠檬酸溶液以 1:1 等体积混匀，用甲酸调 pH 至 2.6）梯度洗脱（0 ～ 9.5 min, 5 % → 7.5 % A; 9.5 ～ 12.5 min, 7.5% → 12% A; 2.5 ～ 30 min，保持 12% A; 30 ～ 40 min, 12% → 19% A; 40 ～ 48 min，保持 19% A; 48 ～ 53 min, 19%→ 45% A; 53～55 min, 45%→80% A）；ECD 检测电压 700 mV；流速

0.6 mL•min^{-1}；柱温 45 ℃，样温 12 ℃；进样量 1 μL。

1.2.4 总酚、总黄酮含量测定及体外抗氧化实验

1.2.4.1 总酚含量测定

参照 Małgorzata 等（2018）的方法并稍作修改，取 250 μL 供试品稀释液（加 80%甲醇稀释 40 倍）和 250 μL 0.25 mol•L^{-1} Folin 酚试剂混合静置 3 min 后，加入 500 μL 15% Na_2CO_3 溶液混匀后暗反应 30 min，离心取上清液于酶标仪 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸溶液为标准，所有样品测量结果均以没食子酸当量（mg•g^{-1}）表示。没食子酸标准品与吸光度值的回归方程为 $y = 0.014\,2x + 0.062\,5$, $R^2 = 0.998\,8$。

1.2.4.2 总黄酮含量测定

参照 He 等（2015）的方法并稍作修改，取 500 μL 供试品稀释液（加 80%甲醇稀释 5 倍）、1000 μL 80%甲醇、250 μL 5% $NaNO_2$ 溶液，混匀放置 6 min 后，加入 250 μL 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液，再混匀放置 6 min，然后加入 2000 μL 4% NaOH 溶液，混匀放置 15 min 后，于酶标仪 510 nm 处测定吸光度。以芦丁溶液为标准，所有样品测量结果均以芦丁当量（mg•g^{-1}）表示。芦丁标准品与吸光度值的回归方程为 $y = 0.000\,91x + 0.046$, $R^2 = 0.999\,2$。

1.2.4.3 铁离子还原能力（ferric ion reducing antioxidant power, FRAP）测定

参照王金梅等（2017）的方法并稍作修改，分别吸取 80 μL 的供试品稀释液（加 80 %甲醇稀释 60 倍），加 80%甲醇至 100 μL 后，加 300 μL TPTZ 工作液混匀反应，5 min 后于酶标仪 593 nm 处测定吸光度。以 Trolox 溶液为标准，所有样品测量结果均以 Trolox 当量（mg•g^{-1}）表示。Trolox 标准品与吸光度值的回归方程为 $y = 0.019\,2x + 0.022\,2$, $R^2 = 0.996\,9$。

1.2.4.4 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基清除试验

参照 Zhang 等（2015）的方法并稍作修改，分别吸取 80 μL 的供试品稀释液（加 80 %甲醇稀释 20 倍），加 80%甲醇至 200 μL 后，再加入 DPPH 自由基母液（DPPH : 80%甲醇= 1 : 10）400 μL，摇匀，暗反应 10 min 后，于酶标仪 517 nm 处测定吸光度。以 80%甲醇为空白组，不同浓度的 Trolox 溶液为对照组。所有样品测量结果均以清除率表示，清除率公式为：DPPH 清除率=（$A_{空白组}$-$A_{样品组}$）/$A_{空白组}$×100%。

1.2.4.5 ABTS 自由基清除实验

参照 Aati 等（2018）的方法并稍作修改，分别吸取 100 μL 的供试品稀释液（加 80 %甲醇稀释 30 倍），加入 200 μL 的 ABTS 工作液，混匀暗反应 20 min 后，于酶标仪 734 nm 处测定吸光度。以 80%甲醇为空白组，不同浓度的 Trolox 溶液为对照组。所有样品测量结果均以清除率表示，清除率公式为：ABTS 清除率=（$A_{空白组}$-$A_{样品组}$）/$A_{空白组}$×100%。

1.2.4.6 氧自由基吸收能力（oxygen radical absorbance capacity, ORAC）测定

供试品溶液加磷酸盐缓冲溶液稀释 500 倍得到供试品稀释液，实验步骤参照徐维盛等（2014）方法，每隔 5 min 测定一次荧光强度，总时间为 3 h。以磷酸盐缓存溶液为空白组，不同浓度的 Trolox 溶液为对照组。所有样品测量结果均以 Trolox（mg•g^{-1}）表示，具体计算公式表示为式（1）和（2）：

$$AUC = 0.5 \times [\,2 \times (f_0 + f_1 + \cdots + f_{n-1} + f_n) - f_0 - f_n\,] \times \triangle t \quad (1)$$

式中：*AUC* 为荧光衰退曲线下面积；*fn* 为第 *n* 个测定点的相对荧光强度；△t 为测定荧光强度的时间间隔。

$$\text{ORAC 值} = [(AUC_{样品组} - AUC_{空白组}) / (AUC_{Trolox} - AUC_{空白组})] \times （\text{Trolox 浓度/样品浓度}） \quad (2)$$

Trolox 标准品与净荧光衰退曲线下面积（AUC_{Trolox}-$AUC_{空白组}$)的回归方程为 $y = 1.368x + 8.301\,9$, $R^2 = 0.994\,6$。

1.2.5 数据处理与分析

采用 Excel 2013 软件进行数据处理和灰度关联分析；SPSS 26 软件进行 Pearson 相关分析和系统聚类分析；SIMCA 14.1 软件进行 PLSR 分析。色谱图和 PLSR 结果通过 Origin 2021 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱方法学考察

①精密度试验：取牡荆叶（批号：S2），按“1.2.2”项下方法制备成供试品溶液，于“1.2.3”项的色谱条件连续进样 6 次，21 个共有峰保留时间的 RSD≤0.45%，峰面积的 RSD≤1.31%，说明试验方法符合分析检测要求。②重复性试验：取牡荆叶（批号：S2），按“1.2.2”项下方法制备成 6 份供试品溶液，于“1.2.3”的色谱条件进样分析，21 个共有峰保留时间的 RSD≤1.72%，峰面积的 RSD≤4.81%，结果表明试验建立的方法重复性较好。③稳定性试验：取牡荆叶（批号：S2）按“1.2.2”制备成供试品溶液，在“1.2.3”的色谱条件下分别于 0、4、8、12、16、18、24 h 进样分析，21 个共有峰保留时间的 RSD≤0.58%，峰面积的 RSD≤3.94%，结果表明 24 h 内稳定性较好。

2.2 HPLC-ECD 指纹图谱的建立及共有峰指认

分别取 18 批牡荆叶，按照“1.2.2”项下制备供试品溶液，同“1.2.3”条件测定并记录色谱图和总峰面积，将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》，以 S8 为参照图谱，生成牡荆叶 HPLC-ECD 指纹图谱（见图 1），混合标准品图（A）和对照指纹图谱（B）见图 2。通过多点校正和 Mark 峰匹配得到 21 个共有峰，其中峰 1、2、5、8、9、11、12、14、15、17 分别为原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异牡荆素、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C。计算其与对照指纹图谱的相似度，相似度结果在 0.816~0.983 之间，样品 S1~S18 的相似度分别为 0.843、0.983、0.967、0.959、0.953、0.916、0.969、0.966、0.968、0.980、0.978、0.953、0.974、0.947、0.964、0.847、0.816、0.950。

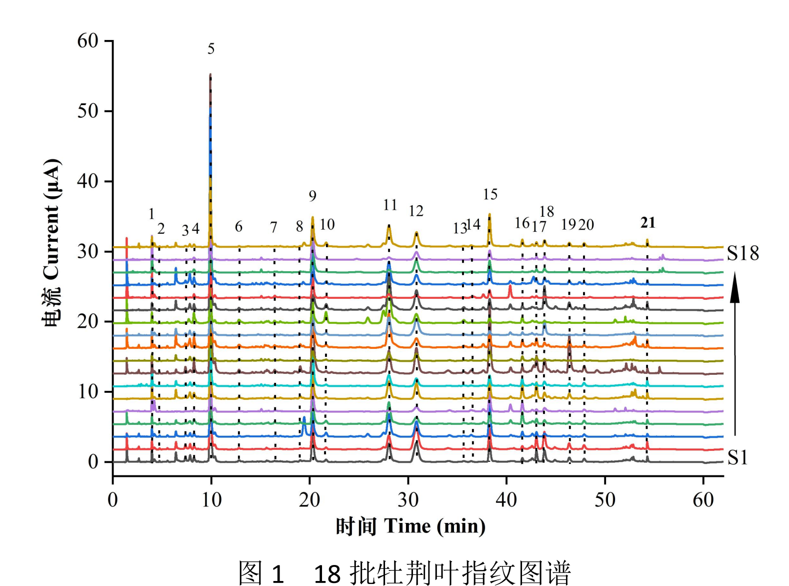
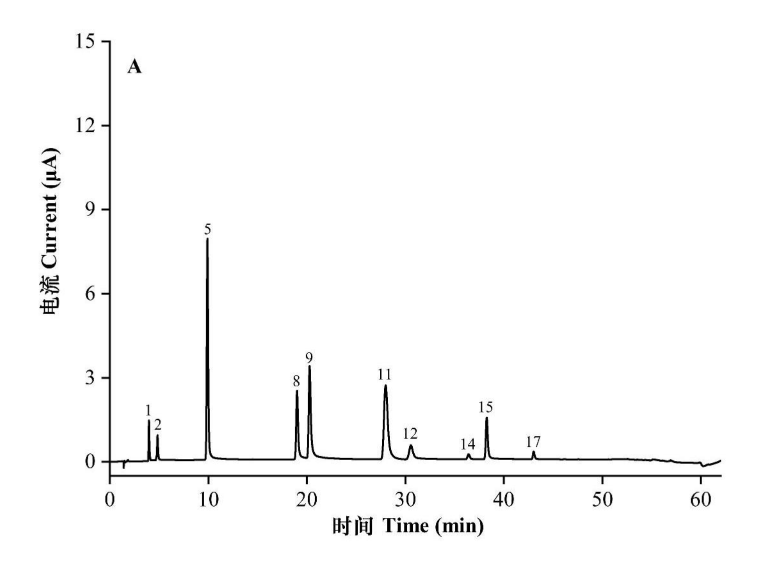


图 1　18 批牡荆叶指纹图谱

Fig.1　Fingerprints of 18 batches of *V. negundo*



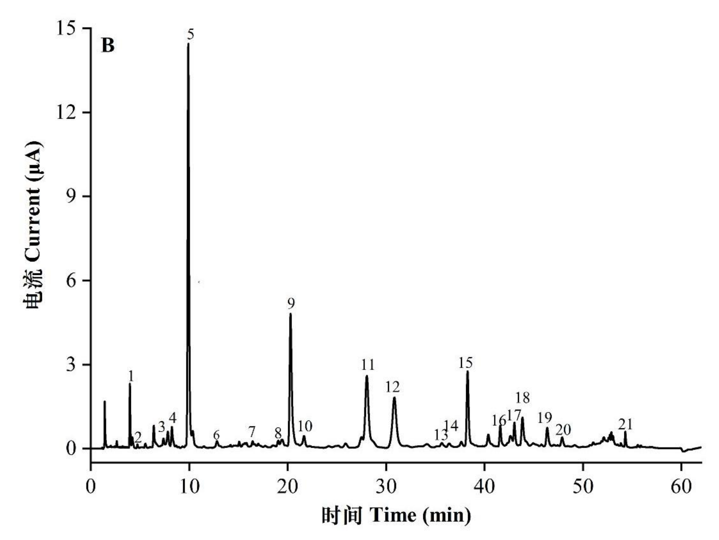


图 2　混合标准品图（**A**）和对照指纹图谱（**B**）

Fig.2　Chromatograms of mixed reference substance (**A**) and reference fingerprint (**B**)

2.3 标准曲线和检测限

分别取“1.2.1”下的对照品溶液制备成系列质量混合标准品溶液，在“1.2.3”条件下，以对照品质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，以信噪比为 3: 1 计算分析方法的检测限（LOD）。结果显示各化合物的在一定的质量浓度范围下，与峰面积有良好的线性相关性（表 2），相关系数大于 0.999，LOD 在 2.2~30.4 ng•mL^{-1}。

2.4 加标回收率实验

称取已知含量的牡荆叶样品，平行精密称定 6 份，加入一定量的对照品混合储备溶液，于“1.2.3”的色谱条件进样分析。结果显示，10 种化合物的回收率在 90.13%~99.56%，RSD ≤6.41%，该方法的准确度良好（表 2）。

表 2　10 种化合物的线性回归方程、检测限和加标回收率

Table 2　Linear regression equations, LODs and recoveries of the 10 compounds

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range (μg•mL^{-1})	检测限 LOD (ng•mL^{-1})	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
原儿茶酸	$y = 23.345x + 0.7875$	0.999 0	0.4~20	2.2	91.68	3.67

Protocatechuic acid						
新绿原酸 Neochlorogenic acid	$y = 7.0378x + 0.702$	0.999 6	0.2~10	6.7	90.13	5.14
绿原酸 Chlorogenic acid	$y = 6.57x + 4.532$	0.999 1	12~600	5.1	99.56	1.47
荭草苷 Orientin	$y = 5.0396x - 0.5302$	0.999 6	0.15~18	11.6	92.73	6.15
异荭草苷 Isoorientin	$y = 4.78x + 2.0423$	0.999 2	8~400	8.2	99.41	2.58
异牡荆素 Isovitexin	$y = 7.5508x - 1.175$	0.999 5	2~200	30.4	91.05	6.41
木犀草苷 Luteoloside	$y = 4.965x + 2.0113$	0.999 7	6~300	10.5	94.59	3.76
异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	$y = 8.76x + 2.223$	0.999 7	0.3~15	15.4	92.24	4.36
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	$y = 7.21x + 2.104$	0.999 7	4~200	16.7	99.06	3.98
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	$y = 10.00x + 2.098$	1.000 0	0.6~30	16.5	93.26	5.03

2.5 含量测定

按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液，于“1.2.3”项的色谱条件下，测定不同产地的10 个化合物含量，结果见表 3。由结果可知，牡荆叶含有丰富的酚酸和黄酮类化合物，不同批次和产地的各成分含量存在较大差异。以各批次含量的平均值计算，其中含量最高的化合物为绿原酸，其次分别为异荭草苷、木犀草苷、异牡荆素、异绿原酸 A、异绿原酸 C、原儿茶酸、荭草苷、异绿原酸 B、新绿原酸。

表 3　牡荆 10 种化合物的含量测定

Table 3　Determination of the 10 compounds in *V. negundo*

样品编号 Sample number	含量 Content (mg•g^{-1})									
	原儿茶酸 Protocatechuic acid	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	荭草苷 Orientin	异荭草苷 Isoorientin	异牡荆素 Isovitexin	木犀草苷 Luteoloside	异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	异绿原酸 C Isochlorogenic acid C
S1	0.159	0.036	5.884	0.079	5.022	6.528	3.478	0.037	0.593	0.067
S2	0.205	0.077	15.773	0.174	7.200	3.404	9.025	0.116	2.495	0.738
S3	0.141	0.074	14.474	0.134	7.165	2.327	10.734	0.117	2.507	0.872
S4	0.141	0.094	10.753	0.022	4.973	3.789	5.753	0.246	5.642	0.281
S5	0.121	0.051	5.850	0.216	7.068	3.609	2.882	0.087	1.240	0.281
S6	0.634	0.067	5.726	0.009	5.396	0.190	1.865	0.303	2.337	0.147
S7	0.171	0.060	7.322	0.334	6.008	3.295	5.980	0.121	2.246	1.259
S8	0.332	0.038	6.962	0.283	8.493	2.038	2.997	0.085	1.438	0.158
S9	0.246	0.099	33.402	0.936	19.352	4.331	9.323	0.404	9.622	1.272
S10	0.104	0.048	6.010	0.041	2.449	1.389	2.629	0.089	1.432	0.258
S11	0.228	0.083	15.073	0.396	11.089	6.432	4.279	0.122	1.877	0.543
S12	0.090	0.027	8.912	0.154	6.621	3.685	8.603	0.042	0.541	0.055
S13	0.114	0.054	15.058	0.159	9.093	6.671	8.369	0.061	1.375	0.074
S14	0.453	0.053	5.139	0.018	4.365	0.591	1.175	0.109	1.033	0.119
S15	0.094	0.067	18.572	0.049	6.994	4.768	4.061	0.081	3.161	0.167
S16	0.542	0.059	4.162	0.128	9.503	0.480	5.002	0.119	1.626	0.184
S17	0.368	0.052	2.686	0.121	7.697	0.541	3.210	0.106	1.086	0.171
S18	0.155	0.056	7.269	0.057	6.491	3.758	6.163	0.201	4.714	0.285

2.6 聚类分析

为了研究产地与含量之间的关系，以 21 个共有峰的相对峰面积为变量，采用 HCA 分析方法，通过 SPSS 26 软件采用平方欧式距离为测量度对 18 批牡荆叶样品进行聚类分析（图 3）。结果表明，当欧式距离为 4 左右时，药材可分为 3 类，即测定的 10 个化合物总的含量为 13.06~31.69 mg•g^{-1}、38.01~41.03 mg•g^{-1}、78.99 mg•g^{-1}。河北产地药材在 13.06~31.69 mg•g^{-1} 区间，而广东和广西的在分类中存在交叉情况。

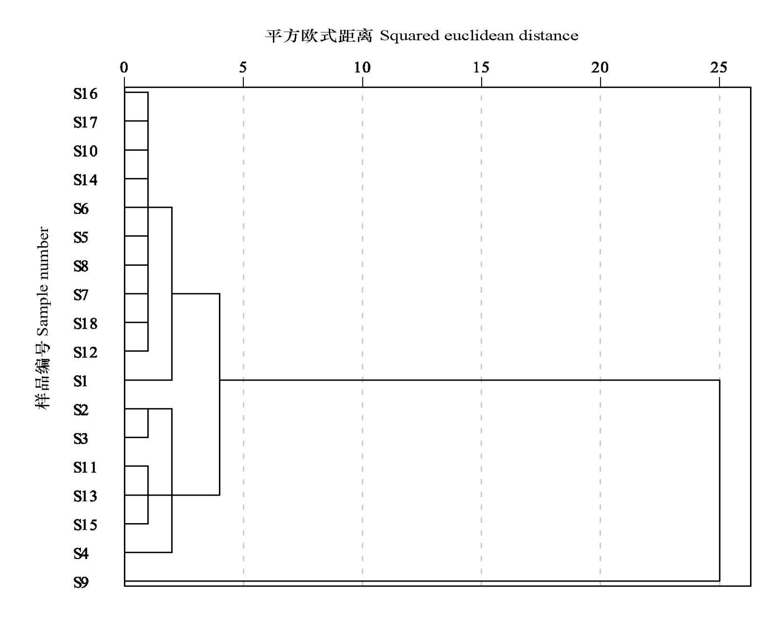


图 3　牡荆叶系统聚类分析

Fig.3　HCA of *V. negundo*

2.7 总峰面积、总酚含量、总黄酮含量及体外抗氧化实验结果

18 批牡荆叶 HPLC-ECD 总峰面积、总酚、总黄酮含量及体外抗氧化实验结果见表 4。由表 4 可知，不同批次牡荆叶的总酚、总黄酮类化合物存在较大差异，其含量分别在 15.82~61.83 mg•g^{-1} 和 27.85~157.65 mg•g^{-1} 之间。牡荆叶具有一定的 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、氧自由基吸收能力及铁离子还原能力，说明牡荆叶 80%甲醇提取物具有一定抗氧化活性。

表 4　总峰面积、总酚、总黄酮和体外抗氧化活性的结果

Table 4　Results of total peak areas, total phenolics, total flavonoids and *in vitro* antioxidant activities

样品编号 Sample number	总峰面积 Total peak area (nA•min)	总酚含量 Total phenolics content（mg•g^{-1}）	总黄酮含量 Total flavonoids content（mg•g^{-1}）	FRAP 值 FRAP value（mg•g^{-1}）	ORAC 值 ORAC value (mg•g^{-1}）	DPPH 清除率 DPPH scavenging rate（%）	ABTS 清除率 ABTS scavenging rate（%）
S1	8 921.67	35.21	77.26	92.91	220.86	40.34	38.15
S2	11 047.03	35.28	78.14	99.08	221.27	36.50	38.24
S3	11 024.16	33.29	74.78	89.70	203.30	33.77	33.75
S4	9 703.31	34.23	75.84	74.75	217.58	31.58	33.23
S5	6 908.73	32.07	67.49	89.16	188.09	35.81	34.01
S6	5 764.26	20.03	37.14	56.18	232.16	19.91	19.99
S7	8 263.87	31.18	69.91	79.54	182.19	34.68	28.29

S8	6 379.86	29.30	61.48	76.78	200.75	31.46	29.05
S9	22 019.76	61.83	157.65	185.33	352.21	90.28	55.84
S10	4 443.38	22.45	49.98	57.44	151.37	18.97	18.88
S11	11 748.60	50.41	114.09	151.63	234.40	43.44	50.38
S12	7 653.31	28.20	58.61	80.79	185.06	21.50	32.07
S13	12 236.62	38.90	83.07	102.04	250.55	26.46	31.31
S14	4 427.90	20.07	40.34	51.71	175.67	11.31	19.43
S15	11 131.31	42.73	98.16	92.83	282.50	44.67	39.29
S16	5 353.85	17.70	32.44	49.58	128.46	8.26	13.40
S17	4 229.23	15.82	27.85	37.46	184.05	14.22	13.48
S18	8 484.97	27.68	59.39	71.44	194.95	30.00	27.20

2.8 谱-效关系分析

2.8.1 Pearson 相关分析

对牡荆叶 HPLC-ECD 样品的总峰面积、总酚含量、总黄酮含量分别与体外抗氧化活性进行通过 SPSS 进行 Pearson 相关分析比较，结果见表 5。

表 5　总峰面积、总酚、总黄酮和体外抗氧化活性的相关系数

Table 5　Correlation coefficients among total peak areas, total phenolics, total flavonoids and *in vitro* antioxidant activities

	总峰面积 Total peak area	总酚 Total phenolics content	总黄酮 Total flavonoids content	FRAP 值 FRAP value	ORAC 值 ORAC value	DPPH 清除率 DPPH scavenging rate	ABTS 清除率 ABTS scavenging rate
总峰面积 Total peak area	1						
总酚 Total phenolics content	0.929**	1					
总黄酮 Total flavonoids content	0.943**	0.995**	1				
FRAP 值 FRAP value	0.915**	0.969**	0.966**	1			
ORAC 值 ORAC value	0.870**	0.840**	0.844**	0.786**	1		
DPPH 清除率 DPPH scavenging rate	0.910**	0.916**	0.940**	0.900**	0.852**	1	
ABTS 清除率 ABTS scavenging rate	0.863**	0.964**	0.951**	0.945**	0.778**	0.888**	1

注：**表示相关性显著（$P < 0.01$）。

Note: ** indicates a significant correlation ($P < 0.01$).

由表 5 可知，牡荆叶中总酚、总黄酮含量分别与 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、ORAC 氧自由吸收能力及铁离子还原能力均具有显著正关性，相关系数大于 0.77 以上。ECD 检测器可选择性地检测具有氧化还原性质的化合物，同时，分析结果也表明 HPLC-ECD 样品总峰面积与总酚、总黄酮含量和体外抗氧化活性也均呈显著相关性。

2.8.2 灰度关联分析

采用均值化法对原始数据进行无量化处理。以不同批次牡荆叶的抗氧化结果作为母序列，以共有峰峰面积作为子序列，分辨系数ρ取 0.5，按照文献（帖晓燕等，2021; Du et al., 2021）方法计算共有峰与药效之间灰度关联度系数（r）的大小，结果见表 6。

表 6　关联度结果

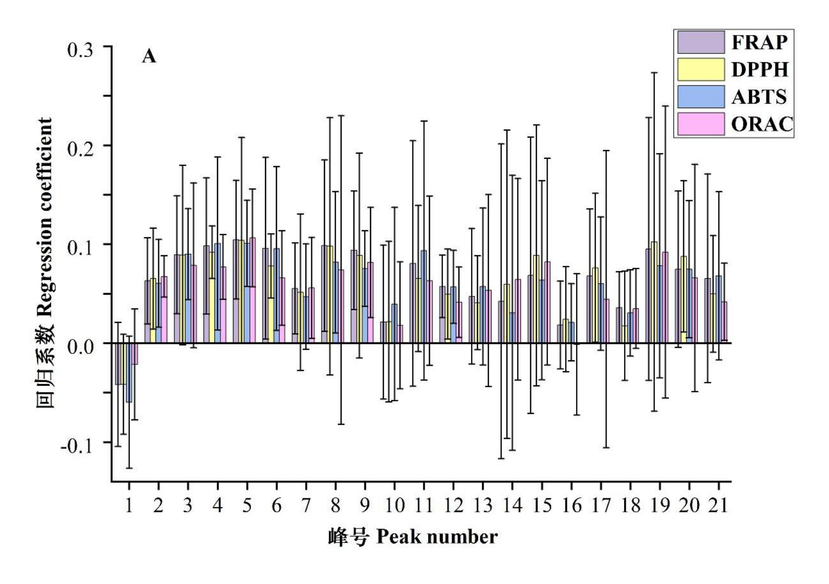
Table 6　Correlation results

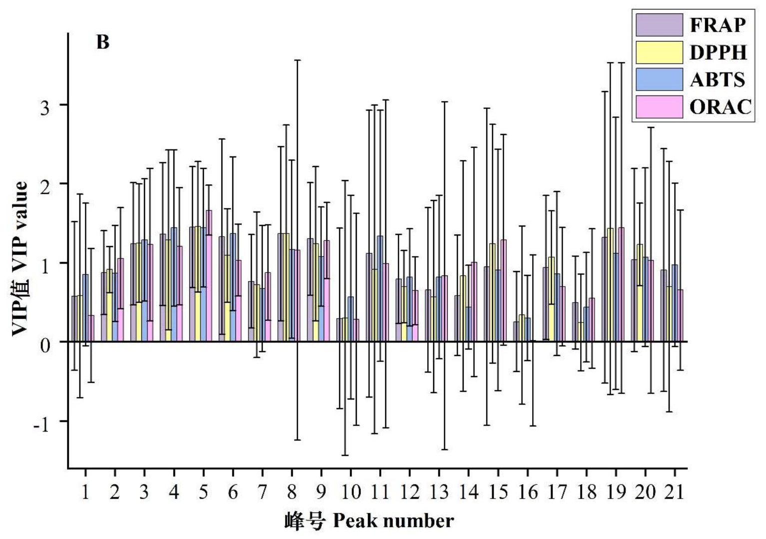
峰号 Peak number	关联度系数 r (FRAP)	峰号 Peak number	关联度系数 r (ORAC)	峰号 Peak number	关联度系数 r (DPPH)	峰号 Peak number	关联度系数 r (ABTS)
9	0.933	2	0.942	5	0.908	4	0.922
4	0.931	9	0.929	9	0.903	2	0.919
6	0.915	4	0.908	4	0.900	9	0.919
2	0.910	6	0.903	20	0.889	6	0.916
5d	0.909	5	0.900	2	0.888	5	0.914
11	0.889	14	0.890	11	0.879	11	0.906
12	0.878	12	0.887	6	0.879	12	0.888
20	0.875	11	0.884	15	0.868	20	0.884
15	0.867	15	0.880	3	0.865	3	0.873
7	0.866	20	0.872	21	0.860	15	0.871
3	0.862	10	0.862	14	0.854	13	0.867
14	0.861	7	0.861	12	0.852	10	0.865
21	0.860	13	0.859	16	0.850	21	0.864
10	0.855	16	0.858	17	0.849	7	0.864
13	0.854	1	0.853	7	0.845	14	0.860
8	0.850	3	0.852	13	0.844	16	0.855
17	0.849	18	0.845	19	0.841	17	0.848
19	0.849	21	0.843	10	0.836	18	0.847
16	0.845	19	0.843	8	0.835	19	0.846
18	0.840	8	0.839	18	0.807	8	0.845
1	0.816	17	0.833	1	0.792	1	0.821

由表 6 可知，牡荆叶中的共有峰与各抗氧化活性的关联度很高，关联度均大于 0.79 以上，表明牡荆叶的抗氧化活性是多种化合物的协同作用结果。以 4 种抗氧化活性关联度的平均值计算，关联度最高的 10 个峰依次为峰 9（异荭草苷）>4>2（新绿原酸）>5（绿原酸）>6>11（异牡荆素）>20>12（木犀草苷）>15（异绿原酸 A）>14（异绿原酸 B）。

2.8.3 PLSR 分析

PLSR 分析是以典型相关分析、主成分分析和多元线性回归分析方法为基础的多元统计方法，能反映共有峰对药效指标的综合贡献程度，相关系数大于 0，表明二者之间呈正相关，反之为负相关；在重要投影（VIP）模型中，VIP 值>1，表明该成分对模型有显著影响（刘晓燕等，2020）。本研究以不同批次的牡荆叶 HPLC-ECD 指纹图谱中各共有峰的峰面积为自变量（X），以不同批次牡荆叶的抗氧化结果为因变量（Y），采用 SIMCA 14.1 软件进行 PLSR 分析，计算 X 对应 Y 的回归系数和 VIP 值，结果见图 4。





FRAP 表示铁离子还原能力；DPPH 表示 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力；ABTS 表示 2, 2′ -联氮-二（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）自由基清除能力；ORAC 表示氧自由基吸收能力。

FRAP indicates the ferric ion reducing antioxidant power; DPPH indicates free radical scavenging ability of the 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine; ABTS indicates free radical scavenging ability of the 2,2’-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ORAC indicates the oxygen radical absorbance capacity.

图 4　牡荆叶各共有峰与抗氧化活性的 PLSR 模型回归系数（**A**）和 VIP 值（**B**）

Fig.4　Regression coefficients (**A**) and VIP values (**B**) of common peaks in *V. negundo* analyzed by PLSR model

由图 4 可知，峰 1（原儿茶酸）和峰 16 与抗氧化效果呈负相关，其余共有峰在 PLSR 模型中与各抗氧化活性的回归系数均呈正相关。共有峰与抗氧活性呈正相关且 VIP 值大于 1 有峰 3、4、5（绿原酸）、6、8（荭草苷）、9（异荭草苷）、19、20。

3 讨论与结论

本研究建立了 18 批牡荆叶药材 HPLC-ECD 指纹图谱，提取出 21 个共有峰，相似度在 0.816 以上，说明不同来源的牡荆叶样品质量较为相近。通过参考文献（罗娅君等，2011; Huang et al., 2015）等资料，借助超高效液相色谱串联质谱仪定性和标准品进行比较，共指认出 10 个峰，并对其进行定量分析，结果表明牡荆叶主要成分为绿原酸、异荭草苷、木犀

草苷和异牡荆素等。通过 HCA 分析可知，牡荆叶药材可能受到采收季节、气候和新老叶等影响，样品分类存在产地交叉情况，而我们所测定化合物的含量差异可能对样品分类起着相对重要的作用。

对牡荆叶进行体外抗氧化实验并进行 Pearson 相关分析比较，结果表明牡荆叶具有较强的抗氧化活性，样品中的总峰面积、总酚、总黄酮和体外抗氧化活性相互之间也均呈显著相关性，这与现有的研究结果（Hu et al., 2015; Wang et al., 2022）相符，说明总酚、总黄酮可能是牡荆叶抗氧化活性的主要化合物，HPLC-ECD 能够检测牡荆叶中的抗氧化活性物质。借助 GRA 和 PLSR 分析方法对牡荆叶的共有峰与抗氧化活性进行谱效关系研究，GRA 分析结果表明牡荆叶的抗氧化活性是多种成分协同作用产生的，同时，结合 PLSR 分析，对牡荆叶抗氧化活性贡献最大为峰 9（异荭草苷），其次为峰 4 和峰 5（绿原酸）。绿原酸已被报道可能是区分牡荆不同药用部位的潜在化学标志物，能作为牡荆质量控制的定量指标之一（Hu et al., 2015），其具有多种功能的生物活性，如抗氧化、抗炎、抗菌等（王文龙等，2017）。同时，Deepha 等（2014）研究表明异荭草苷因含有 3'-OH 的 B 环、分子内氢键、O-H 等结构，在药物植物中表现出很强的抗氧化活性（Deepha et al., 2015），因此，现有研究可反向说明该谱效关系结果的准确性。

综上所述，本研究首次基于 HPLC-ECD 建立牡荆叶药材的指纹图谱，该方法筛选得到的抗氧化活性化合物主要为绿原酸类化合物和黄酮类化合物，化合物含量差异对样品分类有一定的影响，其中异荭草苷和绿原酸对牡荆叶药材抗氧化作用有重要贡献。该方法对药材质量控制的关键成分及质量标志物筛选提供参考，对牡荆叶药材的质量评价体系的完善具有重要意义。

参考文献

AATI H, El-GAMAL A, KAYSER O, 2018. Chemical composition and biological activity of the essential oil from the root of *Jatropha pelargoniifolia* Courb. native to Saudi Arabia [J]. Saudi Pharm J, 27(1): 88-95.

CHINESE PC, 2020. Pharmacopoeia of China: Vol. Ⅰ [M]. 2020 ed. Beijing: China Medical Science Press: 1037. [国家药典委员会，2020. 中国药典：一部[M]. 2020 版. 北京：中国医药科技出版社：1037.]

COMPILATION GNCCHM, 1996. National Chinese herbal medicine mompilation: Vol. 1 [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Press: 792. [《全国中草药汇编》编写组，1996. 全国中草药汇编：上册[M]. 2 版. 北京：人民卫生出版社：792.]

DEEPHA V, PRAVEENA R, SADASIVAM K, 2015. DFT studies on antioxidant mechanisms, electronic properties, spectroscopic (FT-IR and UV) and NBO analysis of C-glycosyl flavone, an isoorientin [J]. J Mol Struct, 1082: 131-142.

DEEPHA V, PRAVEENA R, SIVAKUMAR R, et al., 2014. Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globos* [J]. Spectrochim Acta Pt A-Mol Bio, 121: 737-745.

DU W, ZHU W, GE W, et al., 2021. Research on the effect of spleen-invigorating and anti-swelling active ingredients in crude and processed *Coix* seed based on Spectrum – Effects relationship combined with chemometrics [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 205: 114-350.

HE J, YIN T, CHEN Y, et al., 2015. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers of *Pyrus pashia* [J]. J Funct Foods, 17: 371-379.

HUANG M, ZHANG Y, XU S, et al., 2015. Identification and quantification of phenolic compounds in *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Siebold et Zucc.) Hand.-Mazz. using liquid

chromatography combined with quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometers [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 108: 11-20.

HU P, LI D, WANG K, et al., 2015. New phenolic compounds from *Vitex negundo* var. *heterophylla* and their antioxidant and NO inhibitory activities [J]. J Funct Foods, 19: 174-181.

LIU XY, JIANG YP, ZHANG JB, et al., 2020. Establishment of HPLC fingerprint and its spectrum-effect relationship study of *Humulus lupulus* [J]. China Pharmacy, 31(2): 138-143. [刘晓燕，蒋益萍，张嘉宝，等，2020. 啤酒花的 HPLC 指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究[J]. 中国药房，31(2)：138-143.]

LUO M, GU W, HE T, et al., 2020. Determination of three constituent in *Ligustri Lucidi Fructus* by ultra-High performance liquid chromatography-electrochemical detection [J]. Chin Pharm J, 55(24): 2006-2011. [罗敏，顾雯，何婷，等，2020. 超高效液相色谱-电化学检测法测定女贞子中的 3 种成分[J]. 中国药学杂志，55(24)：2006-2011.]

LUO YJ, BIAN QQ, CHEN J, et al., 2011. Determination of vitexin in *Vitex negundo* var. *cannabifolia* by HPLC [J]. Guihaia, 31(3):418-421. [罗娅君，边清泉，陈佳，等，2011. HPLC 法测定牡荆中牡荆素的含量[J]. 广西植物，31(3)：418-421.]

MALGORZATA D, MONIKA T, PATRYCJA S, et al., 2018. Antioxidant activity as biomarker of honey variety [J]. Molecules, 23(8): 2069-2082.

SHU BY, PENG XY, WEI WK, et al., 2020. Progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Vitex negundo* var.*cannabifolia* [J]. Progr Veter Med, 41(5): 105-110. [舒柄垚，彭新宇，魏文康，等，2020. 牡荆的化学成分及药理作用研究进展[J]. 动物医学进展，41(5)：105-110.]

TIE XY, DAI HR,XIN GX, et al., 2021. Spectrum-effect relationship of petroleum ether fraction of *Aconitum sinomontanum* for promoting qi before and after steaming with licorice juice based on grey correlation analysis [J]. Chin Trad Herbal Drugs, 52(5):1303-1311. [帖晓燕，戴海蓉，辛国雄，等，2021. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系[J]. 中草药，52(5)：1303-1311.]

WANG JM, YAO C, LI CQ, et al., 2017. Spectrum-effect relation of antioxidant activity of *Flos Carthami* based on DPPH, ABTS and FRAP assay [J]. Chin Pharm J, 52(10): 825-831. [王金梅，姚辰，李昌勤，等，2017. 康文艺.基于 DPPH、ABTS 和 FRAP 法的红花抗氧化谱效关系研究[J]. 中国药学杂志，52(10)：825-831.]

WANG Q, XIAO XQ, DONG W, et al., 2017. Spectrum-effect relationship on expectorant efficacy of *Siraitia grosvenorii* [J]. Guihaia, 37(05): 606-609. [王勤，肖喜泉，董威，等，2017. 罗汉果祛痰作用谱效关系研究[J]. 广西植物，37(5)：606-609.]

WANG WL, WEN CY, GUO QP, et al., 2017. Biological properties of chlorogenic acid and its mechanism of action [J]. Chin J Anim Nutr, 29(7): 2220-2227. [王文龙，文超越，郭秋平，等，2017. 绿原酸的生物活性及其作用机制[J]. 动物营养学报，29(7)：2220-2227.]

WANG MY, ZHANG P, ZHANG YZ, et al., 2022. Chemical fingerprinting, quantification, and antioxidant activity evaluation of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. Flowers by UPLC-ECD [J]. Int J Food Prop, 25(1): 648-660.

XIANG R, SHU B, GAO Y, et al., 2021. Chemical constituents and free radical scavenging ability of *Vitex* tract [J]. Chin J Vet Sci, 41(6): 1146-1153. [向蓉，舒柄垚，高原，等，2021. 牡荆提取物主要化学成分分析及自由基清除能力[J]. 中国兽医学报，41(6)：1146-1153.]

XU WS, LI D,LI J, et al., 2014. Study on antioxidant activities of 12 kinds of fruit [J]. Food Ind, .35(1): 247-250. [徐维盛，李东，刘静，等. ORAC 法对 12 种水果总抗氧化能力评价研究[J]. 食品工业，35(1)：247-250.]

YAN CC, ZHANG JF, 2020. Research status of traditional Chinese medicine based on spectrum effect correlation technology [J]. Mod Chin Med. 22(10): 1735-1740. [晏朝操，张建锋，2020. 基于谱效关联技术的中药研究现状[J]. 中国现代中药，22(10)：1735-1740.]

ZHANG L, TU ZC, WANG H, et al., 2015. Metabolic profiling of antioxidants constituents in *Artemisia selengensis* leaves [J]. Food Chem, 186: 123-132.

ZHANG P, CHUN Z, SHAO Q, et al., 2021. Evaluation of the phytochemicals and antioxidant activity of *Lophatherum gracile* brongn based on chemical fingerprinting by HPLC with electrochemical detection [J]. J Sep Sci, 44(20): 3777-3788.